

VU Research Portal

High Resolution Screening of biologically active compounds and metabolites

Kool, J.

2007

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Kool, J. (2007). *High Resolution Screening of biologically active compounds and metabolites*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Hoge Resolutie Screening (HRS) van biologisch actieve verbindingen en metabolieten

Biotransformatie enzymen spelen een cruciale rol in het metabolisme van zowel lichaamseigen als lichaamsvreemde verbindingen. Normaal gesproken levert biotransformatie van verbindingen door deze enzymen minder schadelijke stoffen op die door hun verhoogde wateroplosbaarheid vervolgens makkelijker uitgescheiden kunnen worden. In sommige gevallen echter levert biotransformatie metabolieten op die schadelijker zijn dan hun moederverbindingen. Hetzelfde geldt voor geneesmiddelen. Geneesmiddelen kunnen geactiveerd worden tot toxische reactieve metabolieten die irreversibel kunnen reageren met eiwitten, RNA of DNA, maar kunnen ook geactiveerd worden tot farmacologisch actieve metabolieten die reversibele affiniteit vertonen voor enzymen, receptoren of andere macromoleculen. Hoge affiniteit van geneesmiddelen of hun metabolieten voor de Cytochrome P450 enzymen (CYPs) kan resulteren in gevaarlijke geneesmiddel-geneesmiddel interacties, ook wel drug-drug interacties (DDIs) genaamd. De CYPs spelen een centrale rol in fase I metabolisme reacties van geneesmiddelen en andere exogene verbindingen. De potentiële farmacologische en toxicologische effecten als gevolg van metabolisme maken het noodzakelijk dat ze in een zeer vroeg stadium van medicijnontwikkeling onderzocht moeten worden op hun potentiële positieve of negatieve effecten. Fase II metabole enzymen, waartoe Glutathion S-transferases (GSTs), Glucuronyl-transferases (GTs) en Sulfo-transferases (STs) behoren, koppelen lichaamseigen functionele groepen toe aan de verbindingen, hetgeen gewoonlijk resulteert in metabolieten met een verhoogde hydrofiliciteit ten opzichte van hun moederverbindingen en in een gefaciliteerde uitscheiding. De GSTs katalyseren de conjugatie van electrofiele verbindingen met Glutathion (GSH) en zijn daarom belangrijke enzymen voor de detoxificatie van dergelijke stoffen.

Voor het screenen van mengsels van stoffen, zoals synthesesemengsels en extracten van planten, op affiniteit of activiteit voor farmaceutisch relevante enzymen of receptoren, worden vaak "High Throughput Screening" (HTS) screenings-technieken gebruikt. De meeste HTS technieken hebben echter als groot nadeel dat ze niet in staat zijn om de individuele actieve stoffen te identificeren in mengsels van stoffen waarin activiteit gevonden is. Hiervoor moeten de individuele verbindingen in het mengsel allereerst (meestal chromatografisch) gescheiden worden, waarna een her-screening van de gescheiden

individuele stoffen uit het mengsel plaats vindt. Een aantal jaren geleden echter is een nieuw concept genaamd Hoge Resolutie Screenen (HRS) gelanceerd, waarin een chromatografische scheiding direct gekoppeld wordt aan een activiteit-assay voor een relevant farmaceutisch enzym of receptor. Met deze HRS-technologie is het mogelijk geworden om de individuele actieve verbindingen in complexe mengsels te identificeren. Inmiddels zijn er HRS-methodologiën ontwikkeld voor bijvoorbeeld de estrogene receptor, fosfodiesterases, acetylcholine esterase en angiotensine converterende enzymen.

Aangezien het bij de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen erg belangrijk is om snel de farmacologisch of toxicologisch relevante metabolieten met affiniteit voor relevante enzymen en receptoren te achterhalen, staat in dit proefschrift onderzoek naar de toepasbaarheid van de HRS-technologie voor het screenen van actieve metabolieten in complexe mengsels van stoffen centraal. Ook is onderzoek gedaan naar methoden voor snelle en geautomatiseerde vorming van metabolietmengsels en naar methodes om deze vervolgens at-line aan te sluiten op HRS screeningsmethoden voor deze metabolietmengsels. Verder hebben we HRS methoden ontwikkeld voor het screenen van individuele verbindingen in mengsels die affiniteit vertonen voor verschillende metabole enzymen, met name de CYPs en de GSTs. Hierdoor kunnen potentiële DDI verbindingen (en andere stoffen die met deze enzymen interfereren) opgespoord worden. Ook is er gekeken naar HRS systemen om pro-oxidanten en anti-oxidanten in mengsels op te kunnen sporen. Pro-oxidanten kunnen schadelijke effecten vertonen in het lichaam, terwijl anti-oxidanten deze effecten weg kunnen vangen. Behalve voor de farmaceutische industrie kunnen de in dit proefschrift beschreven HRS-methodologiën ook gebruikt worden voor milieuonderzoek en in de voedingsindustrie.

De algemene introductie van dit proefschrift behandelt metabolisme enzymen, farmacologisch relevante enzymen en receptoren, bio-activering en bio-inactivering, en het HRS-concept. Deel I van het proefschrift gaat vervolgens in op de ontwikkeling en validatie van HRS methodologiën om interacties van individuele verbindingen in mengsels met CYPs te kunnen screenen. CYPs zijn verreweg de belangrijkste biotransformatie enzymen voor geneesmiddelen. Deel II behandelt het screenen van complexe metabole mengsels op affiniteit voor de estrogene receptor. Bovendien wordt in dit deel een volledig geautomatiseerde biokatalyse unit beschreven die geschikt is om metabole mengsels van geneesmiddelen te genereren en direct te koppelen aan HRS-methodologiën. Hierdoor kunnen on-line gegenereerde metabolieten snel en efficiënt gescreend worden op

mogelijke bioaffiniteit voor relevante farmaceutische target enzymen of receptoren. Deel III van dit proefschrift beschrijft een HRS methodologie om snel en efficiënt individuele GST liganden en substraten in mengsels te identificeren. Een ander mogelijk belangrijk gevolg van biotransformatie door CYPs is de vorming van reactieve zuurstof intermediaren tijdens het metabolisme van endogene en exogene verbindingen. Deel III van dit proefschrift beschrijft ook een HRS methode om verbindingen die reactieve zuurstof intermediaren kunnen genereren op te sporen. Deze HRS methode is niet alleen geschikt om dergelijke pro-oxidanten aan te tonen, maar ook om anti-oxidanten te detecteren. De ontwikkelde HRS methodologie is speciaal geschikt om dergelijke verbindingen individueel aan te tonen in mengsels van stoffen. In Deel IV van het proefschrift staan een samenvatting alsmede de algemene conclusies en een toekomst visie.

Al met al geven de resultaten in dit proefschrift de uitstekende mogelijkheden van HRS aan voor het screenen van verbindingen in mengsels die affiniteit vertonen voor metabole enzymen. Dit is van essentieel belang om potentiële DDI verbindingen op te sporen, die negatieve bijwerkingen van geneesmiddelen kunnen veroorzaken. Ook is duidelijk aangetoond dat HRS een zeer goede techniek is voor het screenen van actieve metabolieten in metabole mengsels. Deze bevindingen kunnen van groot belang zijn bij de ontwikkeling van medicijnen, onderzoek naar de veiligheid van medicijnen en in voedselonderzoek, waarbij bioactieve verbindingen (vaak aanwezig in mengsels) een belangrijke rol spelen. Met de verdere ontwikkeling van de hierboven genoemde technieken kan HRS een van de belangrijke screening technologieën worden in de genoemde onderzoeksgebieden.